



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académica Profesional de Ciencias Biológicas

**Expresión diferencial de marcadores de células de
Sertoli durante el desarrollo testicular de ratón**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en
Zoología

AUTOR

Sheyla Estefani CISNEROS MONTALVO

ASESOR

Martha VALDIVIA CUYA

Jorma TOPPARI

Emmi ROTGERS

Lima, Perú

2014

RESUMEN

La espermatogénesis está regulada por la expresión de miles de genes que codifican proteínas específicas durante cada fase de diferenciación celular (Ryser *et al.*, 2011). La célula de Sertoli, encargada de la nutrición y soporte de la espermatogénesis, presenta cambios morfológicos y funcionales durante la pubertad, en la cual se transforma de una célula proliferativa (inmadura) a una no proliferativa (madura). Este proceso de maduración de las células de Sertoli durante el desarrollo testicular implica un rápido cambio morfológico y fisiológico que supone una cascada de modificaciones en la expresión de genes. Los estudios de su expresión, regulación positiva y negativa de estos genes en el ratón como modelo son idealmente informativos debido a que permiten analizar e interpretar desórdenes de diferenciación sexual o desarrollo testicular en el humano tales como daño testicular, detención de la espermatogénesis, síndrome de Sertoli solo o neoplasia de células madres espermatogoniales que traen como consecuencia la incapacidad para ejecutar las funciones de soporte del proceso de espermatogénesis, produciendo un tamaño testicular reducido o incluso baja producción de espermatozoides (Anniballo *et al.*, 2011). El objetivo de esta tesis fue investigar si existe una expresión diferencial de ciertos genes expresados en las células de Sertoli durante el desarrollo testicular del ratón. Se usaron ratones (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) macho de la cepa FVB/NCrl divididos en grupos etarios, desde embriones de 12.5 dpc hasta ratones en la etapa adulta de 120 dpp. Se emplearon testículos frescos para evaluar la expresión génica de la hormona Antimülleriana (AMH), Citoqueratina 18 (Krt18), Vimentina (VIM) mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR). El antígeno 1 del tumor de Wilms (WT1) fue usado como un control del número de células de Sertoli durante el desarrollo debido a su expresión constante. Por otra parte para el método de inmunofluorescencia, los testículos fueron fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% y

embebidos en parafina para su posterior seccionamiento en cortes histológicos de 5 micras y tinción. En los resultados se observaron que el gen AMH y Krt18 son óptimos para ser usados como marcadores de células de Sertoli inmaduras, debido a una expresión relativa alta durante el estado de embrión y ratón recién nacido. Mientras que el gen VIM no es sugerido como marcador molecular para células de Sertoli. Los resultados fueron correlacionados con el método de inmunofluorescencia, siendo resultados positivos. Se concluyó que AMH, Krt18 y VIM son regulados en las células de Sertoli durante el desarrollo del testículo del ratón (*Mus musculus*).

Palabras clave: espermatogénesis, célula de Sertoli, expresión génica, AMH, Krt18, VIM y WT1.

ABSTRACT

Spermatogenesis is regulated by the expression of thousands of genes encoding proteins specific for each phase of cell differentiation. The Sertoli cell, charged in nutrition and spermatogenesis support, undergoes morphological and functional changes during puberty, which is transformed from a proliferative cell (immature) to a non proliferative stage (mature). This process of maturation of Sertoli cells during testicular development involves rapid morphological and physiological change that involves a cascade of changes in gene expression. Studies of its expression, positive and negative regulation of these genes in the mouse model are ideally informative because they allow us to analyze and interpret disorders of sexual differentiation and testicular development in humans such as testicular damage, syndrome Sertoli-cell-only (SCO) or intratubular neoplasia of spermatogonial stem cells that result in the inability to perform the functions supporting the process of spermatogenesis, resulting in reduced testicular size or even reduced sperm production (Anniballo *et al.*, 2011). The aim of this thesis was to investigate whether there is a differential expression of certain genes expressed in Sertoli cells during mouse testis development. Male FVB/NCRL strain mice divided into age groups were used. These groups were composed of various ages from 12.5 dpc embryos to 120 dpp adult mice. Fresh testes were used to assess gene expression of Anti-Müllerian hormone (AMH), Cytokeratin 18 (Krt18), vimentin (VIM) by real-time PCR (RT- qPCR). The antigen Wilms tumor 1 was used as a control in the number of Sertoli cells during development because of its constant expression. In addition, immunofluorescence method was performed. The testes were fixed in paraformaldehyde (PFA) at 4% and were then embedded in paraffin for subsequent histological sectioning cut at 5 microns and stained. The result shows that AMH and Krt18 genes are optimal for use as markers of immature Sertoli cells due to high relative expression during the embryonic and newborn mouse. While gene VIM is not

suggested as a molecular marker for neither immature nor mature Sertoli cells. The results were correlated with the immunofluorescence method (IF), yielding positive results. We conclude that AMH, KRT18 and VIM are regulated in Sertoli cells during mouse developing testis.

Keywords: spermatogenesis, Sertoli cell, gene expression, AMH, KRT18, VIM and WT1.